

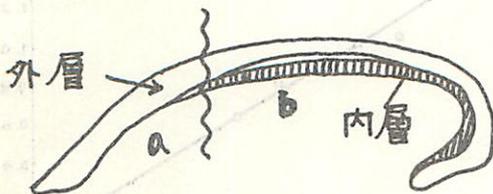
マイクロケルダール法による貝殻中の窒素分析法の検討および2, 3の実験

渡辺 剛 忠*

I はじめに

佐渡ヶ島の地下水の理化学的性質について数年来調査してきたが、とりわけ興味の深かったのは新潟県佐渡郡佐和田町沢根地域の地下水であった。鮮新世後期の砂、シルト層に含まれている各種の貝化石が地下水中に溶出し、硬度の高い水になっているのである(渡辺, 1972)。そこで化石はどのように保存されており、どのように地下水中に溶出されるものなのかその過程をあきらかにしたいと考えた。そのために化石中に残存している無機物、有機物の量を求めることにした。今報ではその1つの方法で貝殻中の窒素量を測定し、コンキオリン量を推定する田崎(1967)の方法について追試し、若干改良した点と、現生貝について2, 3の実験を試みた結果を報告する。

研究をすすめるにあたって、ご助言とはげましをして下さった、東京教育大学理学部地質教室、大森昌衛氏、羽茂高枝、齊藤良二郎氏、分析法の指導のご意見をいただいた東京教育大学理学部地質教室、堀田進氏、東京医科歯科大学歯学部解剖学教室、後藤仁敏氏、また、文献を心よく提供下された北海道大学理学部地質教室、秋山雅彦氏、貝殻の実験などご助言や原稿の検討などをしていただいた新潟大学理学部地質教室、小林巖雄氏に心から感謝いたします。



第1図 二枚貝における分析部分(a)

II 試料および分析法

1) 試料

実験に使用した貝殻(現生貝)の種類は、シジミ、ベンケイガイ、バカガイ、マガキ、アカガイ、アサリ、バイである。二枚貝の場合は第1図に示したようにaの部分を使用したし、巻貝は全体を使用した。ただし、殻皮はとり除いた。

2) 分析法

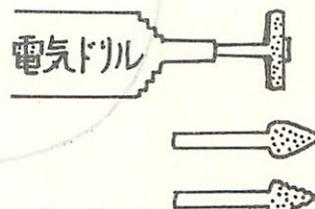
本論で用いた方法はマイクロケルダール法による貝殻の分析法(田崎, 1967: 化石研究会編, 1971)によったが、ここではとくに検討をおこなった2, 3の点について述べる。

A) 貝殻の処理について

殻皮をけずり取ったり、貝殻を切断するのに第2図のような歯科医用切削器具を電気ドリルのアームにつけて使用した。洗滌は中性洗剤でよく洗い、メチルアルコールで洗って乾燥後粉末にした。その一定量を正確に秤量したが、試料は粉末にしてもしなくとも分析値にあまり差異は認められなかった(第3図)。

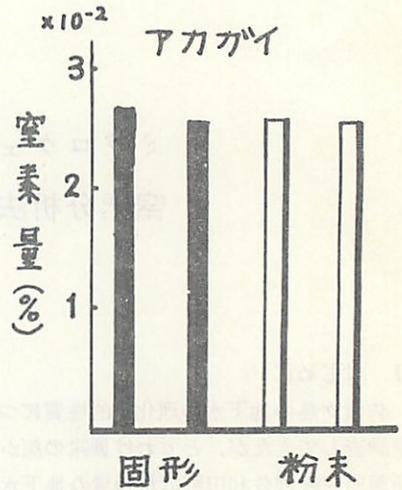
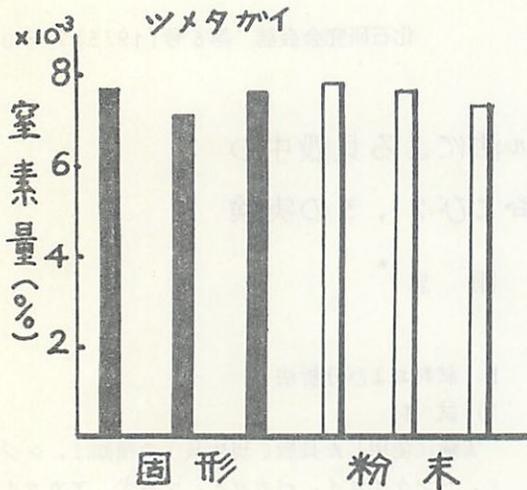
B) 脱灰および蒸留について

従来の方法(化石研究会誌, 化石の研究法, 1971, P.572~573)によれば、"脱灰に使用する濃硫酸の量は試料の量に応じてその過剰をとりコルベ中で熱する"方法を取り、さらに"蒸留の際の中和に用いる10N-NaOH 使用量が7mlとしているが、追試をした結果次のような改良すべき点が見い出された。



第2図 貝殻の切削具

* 新潟県立相川高等学校



第3図 試料を粉末にするとしないときの分析値の比較

マイクロケルダール法で使用できる試料の量は脱灰の際のコルベンの容積と蒸留の際のコルベンの容積できまり、貝殻試料の1g前後が分析可能な最大量であった。脱灰液として使用する濃硫酸の量は3.0ml以内ではコルベンを強く熱した場合に固化する場合が多く、そのときはコルベんにひびわれが生ずる。また5.0mlをこえるとはげしい突沸のためコルペン中の内容物が外に出てしまう。したがって、固化しないでスムーズに脱灰できる濃硫酸の量は3.5~4.0mlが適当であり、筆者は脱灰用硫酸の量を4.0mlにした。

一方、蒸留操作においては分解で生じた $\text{NH}_4 \cdot \text{H} \cdot \text{SO}_4$ に10N-NaOH溶液を加え中和して NH_3 にする必要がある。筆者の実験した限りでは、脱

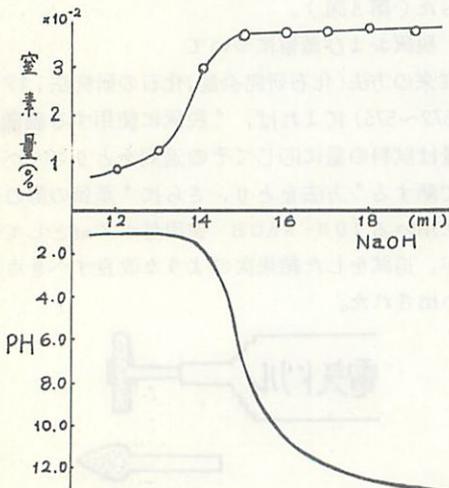
灰用硫酸4.0ml、分解用硫酸1.0mlを使用した場合、中和点に達する10N-NaOH溶液の量は14.5mlであった(第4図)。

なお、試料を多くとった場合、それにつれて蒸留コルペンの内容物も多くなり、冷却延管内に NH_3 の気体だけでなく内容物そのものが入りこみデーターのばらつく原因になることがある。特にこの点にも注意を要した。その結果、現生シジミガイにおける試料の質量と含有窒素量との関係を求め、ほぼ満足できる値を得た。それを第5図に示した。

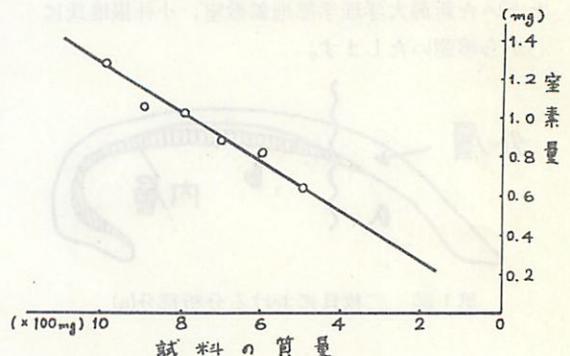
III 結果

A. 温度との関係

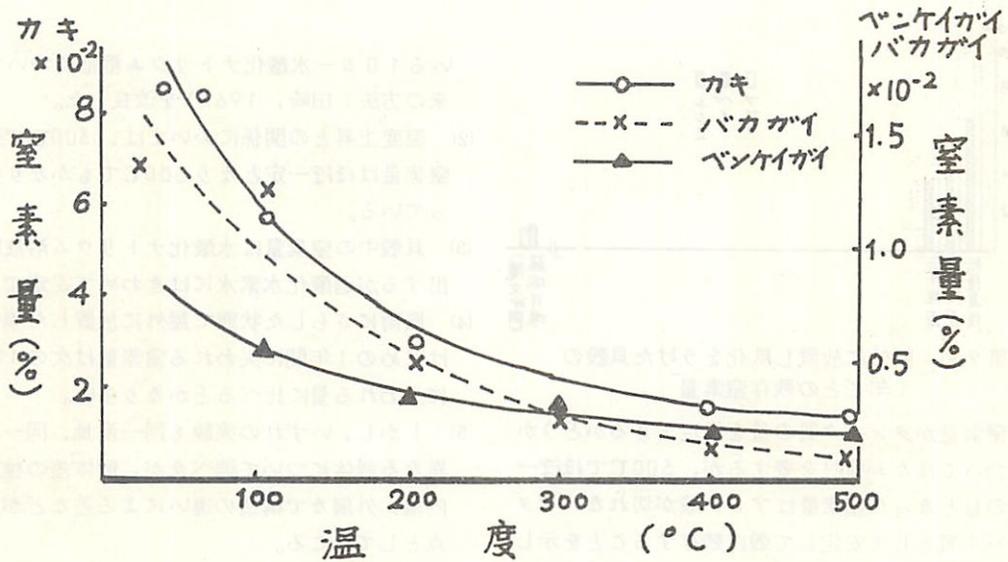
粉末にした貝殻(ベンケイガイ・マガキ・バカガイ)を電気炉に入れ、およそ、1時間に500℃まで上昇させた。100℃ごとに粉末を取り出し含まれている窒素量を求めた。その結果を第6図に示す。温度上昇とともに粉末の色は変化し、200



第4図 10N-NaOH溶液の添加量とpHの変化および窒素量(カガミガイ使用)



第5図 シジミガイにおける試料の質量と含有窒素量との関係



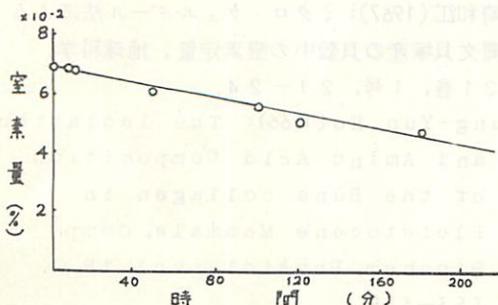
第6図 温度変化と残存窒素量

~300°Cでうすいきつね色になり、400~500°Cで灰黒色になる。また、200°C付近になると有機質の燃焼したときのような臭気が強烈にしはじめる。残存していた窒素量は、貝殻の種類によって異なるが、300°Cまで急激に減少し、その後はほぼ一定となる。

B. 水酸化ナトリウム溶液、および過酸化水素水との関係

アカガイの殻を0.2N水酸化ナトリウム溶液に浸したのち、経過時間と残存窒素量との関係を第7図に示す。第7図は時間経過とともにほぼ直線関係に減少する。

一方、アカガイの殻を10%過酸化水素水中に放置したものについて放置時間経過と窒素量の関係を第8図に示す。200時間までは分析値にばらつきがあるが、ほぼ一定値で、ほとんど窒素が溶出していないことを示している。



第7図 0.2N-NaOH溶液中における残存窒素量(アカガイ使用)

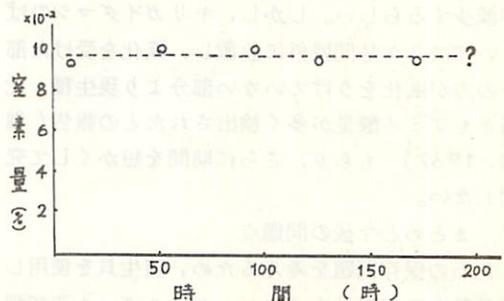
C. 2年間に失われる量(屋外)

アサリ、シジミ、バイの殻を風雨にさらした状態で屋外に放置してのち、1年後、2年後の殻の窒素量を第9図に示した。その結果、窒素量は経過年数とともに減少することを示し、はじめの1年間に失われる量は次の1年間に失われる量のアサリで約2倍、バイで約5倍であることを示す。

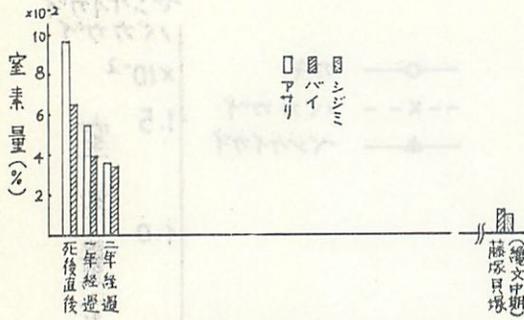
IV 考察

貝化石中の有機物についてはAbelson(1954)以来数多くの分析例があり、Abelson(1954)、井尻・藤原(1955)、秋山(1964)、堀田(1965)、堀田信子(1967)、Ho(1966)などによって検討されている。

なかでも貝殻中の有機物についてはGrégoire(1964)によって700°Cの熱処理をおこなった殻にあってはピウレット反応が陽性でタンパク質として存在していると報告されている。筆者の求め



第8図 10% H₂O₂ 溶液中における残存窒素量(アカガイ使用)



第9図 屋外に放置し風化をうけた貝殻の1年ごとの残存窒素量

た窒素量がタンパク質の量を推定できるかどうかについてはなお検討を要するが、300℃でほぼ一定の量となった窒素量はアミノ酸が切れないうタンパク質として安定して殻に残存することを示しているかも知れない。それにしても500℃においてもまだかなりの窒素量が残っており、有機物が無機物によって安定化される一例と言えよう。さらにこのような結果は続成作用での化石の安定さをうらづけるものと考えられる。

保存問題の考察はいろいろの要素があり、むづかしいと思われるがアカガイにおける水酸化ナトリウム溶液処理と過酸化水素水処理における比較では、少なくとも殻を介して外部の液が有機物に作用することを示していると思われる。水酸化ナトリウム溶液処理では時間経過とともにほぼ直線関係に減少しており、貝殻中の有機物が徐々に溶出することがわかる。一方、過酸化水素水で処理したものは、ほとんど溶出しておらず、貝殻中の有機物は過酸化水素水に対してきわめて安定なことを示している。

風雨にさらした状態で屋外に放置したものでははじめの1年間に失われる量が次の1年間に失われる量よりはるかに多く、貝殻は死後急激に窒素が減少するらしい。しかし、キリガイダマンのばあいでは2ヶ月間屋外に放置し、風化を受けた部分の方が風化をうけていない部分より現生種、化石ともアミノ酸量が多く検出されたとの報告(堀田, 1967)もあり、さらに期間を短かくして究明したい。

V まとめと今後の問題点

化石の保存問題を考えるため、現生貝を使用して貝殻中の窒素量をマイクロ・ケルダール法で測定して次の結論を得た。

(1) 分析に際して分解用濃硫酸と蒸留時中和に用

いる10N-水酸化ナトリウム溶液について従来の方法(田崎, 1967)を改良した。

- (2) 温度上昇との関係においては、300℃で残存窒素量はほぼ一定となり500℃でもかなりのことっている。
- (3) 貝殻中の窒素量は水酸化ナトリウム溶液に溶出するが過酸化水素水にはきわめて安定である。
- (4) 風雨にさらした状態で屋外に放置した場合、はじめの1年間に失われる窒素量は次の1年間に失われる量に比べるとかなり多い。
- (5) しかし、いずれの実験も同一産地、同一種の異なる個体について調べたが、個体差の検討や内層、外層などで構造の違いによる差などが問題点としてのこる。

参考文献

- 秋山雅彦(1964): 化石ホタテガイ属の殻にふくまれるアミノ酸の定量分析, 地質学雑誌, 70巻 842号, 508-516.
- 秋山雅彦・藤原隆代(1966): 縄文貝塚の貝殻に残っているアミノ酸, 資源研彙報, 67号, 67-72.
- Grégoire, Ch. (1964): Thermal Changes in the Nautilus Shell, Nature, vol. 203, 848-869.
- 化石研究会編(1971): 化石の研究法, 共立出版, 572-575.
- 堀田進(1965): 化石タマキガイに残存するアミノ酸, 地質学雑誌, 71巻, 842号, 554-556.
- 堀田信子(1967): 本邦産 Turritella に残存するアミノ酸, 地質学雑誌, 73巻, 7号, 315-324.
- 田崎和江(1967): ミクロ・ケルダール法による縄文貝塚産の貝殻中の窒素定量, 地球科学, 21巻, 1号, 21-24.
- Tong-Yun Ho(1966): The Isolation and Amino Acid Composition of the Bone collagen in Pleistocene Mammals, Comp. Biochem, Physiol., vol. 18, 353-358.
- 渡辺剛忠(1972): 佐渡の地下水の理化学的性質について, 新潟の自然, 2集, 190-196.